

INTERET DES APPROCHES GLOBALES EN RADIOPROTECTION

Jérôme Lamartine et Michèle Martin

CEA, Service de Génomique Fonctionnelle
2 rue Gaston Crémieux. 91057 Evry Cedex. France

La biologie expérimentale est en train de subir une profonde évolution liée au développement des approches globales d'analyse cellulaire. De cette évolution technologique, marquée au cours des années 90 par l'émergence des méthodes d'analyse du transcriptome et du protéome, est née une révolution conceptuelle : la possibilité d'étudier les objets biologiques comme des systèmes intégrés. L'émergence de ces nouvelles approches expérimentales ouvre de larges perspectives tant en biologie fondamentale qu'appliquée, et notamment dans le domaine de la radiobiologie et de la radioprotection.

Les méthodes globales d'analyse d'expression, comme les puces à ADN, sont largement utilisées pour identifier de nouveaux marqueurs d'exposition aux radiations ionisantes. Les puces à ADN sont des micro-surfaces de verre sur lesquelles sont déposées des milliers de sondes d'ADN permettant une mesure comparative de l'abondance des ARN messagers dans plusieurs populations cellulaires. Cette technique permet de rechercher à l'échelle du génome des gènes induits ou réprimés dans les cellules irradiées, qui pourront être ensuite des marqueurs diagnostics de l'exposition aux radiations. Nous avons effectué une telle recherche dans les kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, un des premiers tissus touchés lors d'une irradiation externe. Les kératinocytes sont un type cellulaire pertinent en terme d'outil diagnostic car ils peuvent être aisément prélevés par un examen non invasif de décollement des cellules les plus superficielles de la peau, ou par prélèvement de follicules pileux. Nous avons étudié dans les kératinocytes différenciés les effets de plusieurs doses d'irradiation, de la dose médicale de 2 Gy à une faible dose de 1 cGy proche de la dose d'exposition naturelle annuelle. Nous avons mis en évidence de nouveaux mécanismes de la réponse à l'irradiation, notamment une mobilisation des ressources énergétiques via le métabolisme de l'ATP [1]. Nous avons également identifié des dizaines de marqueurs géniques répondant à l'irradiation. Nous avons observé que la dose de 1 cGy provoque une forte réponse génique, dont une majeure partie est spécifique de cette faible dose [2]. De plus, l'étude cinétique montre que la réponse à la dose de 2 Gy est une réponse immédiate, qui survient dans les premières heures après l'irradiation alors que la réponse à la faible dose est plus tardive : 48 voire 72h après l'irradiation. En étudiant les profils de réponses temporelles nous avons pu identifier des groupes de gènes qui montrent des cinétiques de réponse identiques, ce qui suggère qu'ils sont co-régulés. L'analyse bio-informatique des séquences promotrices de ces gènes a permis d'identifier des motifs communs susceptibles d'être impliqués dans cette régulation [2]. Certains de ces motifs sont reconnus par des facteurs de transcription, dont l'implication dans le contrôle de la réponse transcriptionnelle à l'irradiation est actuellement en cours de validation. Ce travail démontre toutes les potentialités des approches globales. L'étude transcriptionnelle à grande échelle permet d'identifier des marqueurs d'irradiation, qui peuvent être testés *in situ* dans le tissu irradié. Ainsi nous avons pu retrouver *in vivo* l'induction de gènes pendant les premières heures après l'irradiation. De plus, certains de ces marqueurs précoces sont retrouvés dans la peau irradiée de patients de radiothérapie, jusqu'à 20 ans après le traitement, ce qui suggère des relations entre les effets précoces et tardifs d'une irradiation ionisante. L'étude cinétique conduit à la mise en évidence de groupes de gènes, dont on peut identifier les régulateurs par des approches informatiques, puis les valider par des méthodes classiques de biologie et de biochimie.

Des approches similaires ont été menées *in vitro* par d'autres groupes sur des types cellulaires variés, notamment des cellules lymphoïdes, mais également *in vivo* en analysant des cellules sanguines de patients de radiothérapie. Ce travail, récemment publié par l'équipe de Sally Amundson du NIH [3], a permis également de retrouver *in vivo* des marqueurs géniques d'irradiation préalablement identifiés par des analyses d'expression sur des cellules en culture : il confirme l'intérêt des modèles cellulaires et des études d'expression pour identifier des marqueurs d'irradiation pouvant être utilisés ensuite pour le diagnostic d'irradiation chez l'Homme.

Avec le développement de bases de données de profils d'expression, on peut également envisager de définir des signatures moléculaires de doses d'irradiation permettant de diagnostiquer le niveau d'exposition d'un individu irradié. Un tel dosimètre biologique est en cours de développement au Service de Génomique Fonctionnelle du CEA. Des études préliminaires sur des souris irradiées *in toto* montrent que l'on peut relier la dose d'exposition (entre 2 cGy et 5 Gy), avec des profils d'expression spécifiques 48h après l'irradiation. La mise en place d'un tel diagnostic chez l'Homme nécessite une étude approfondie des variations individuelles d'expression des marqueurs d'irradiation dans différents types cellulaires, comme les cellules sanguines ou les cellules de la peau.

Les approches globales ouvrent des perspectives prometteuses en radiobiologie, par une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires de la réponse à l'irradiation. Les applications de ces méthodes en radio-protection passent par la mise au point d'outils de terrain permettant un diagnostic de l'exposition aux radiations, et une évaluation de la dose reçue, de 24 heures à 7 jours après l'irradiation.

REFERENCES

1. Lamartine, J., Franco, N., Le Minter, P., Soularue, P., Alibert, O., Leplat, J., Gidrol, X., Waksman, G., and Martin, M. (2004). Activation of an energy providing response in human keratinocytes after gamma-irradiation. *J Cell Biochem in press*.
2. Franco, N., Lamartine, J., frouin, V., Le Minter, P., Petat, C., Leplat, J., Libert, F., Gidrol, X., and Martin, M. (2004). Low-dose exposure to gamma rays induces gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiation Research* **En revision**.
3. Amundson, S. A., Grace, M B., McLeland, C. B., Epperly, M. W., Yeager, A., Zhan, Q., Greenberger, J. S., and Fornace, A. J., Jr. (2004). Human *in vivo* radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Res* **64**, 6368-71.